

10/609358 7-25-3 FOR
(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Mai 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/36794 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 7/00, 1/00 // C12N 9/08

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/04107

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Oktober 2001 (27.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 54 082.1 31. Oktober 2000 (31.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52428 Jülich (DE).

(71) Anmelder (nur für US): STECKHAN, Christiane (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Uwe (Erbe des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Antje (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Heike (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE).

(72) Erfinder: STECKHAN, Eberhard (verstorben).

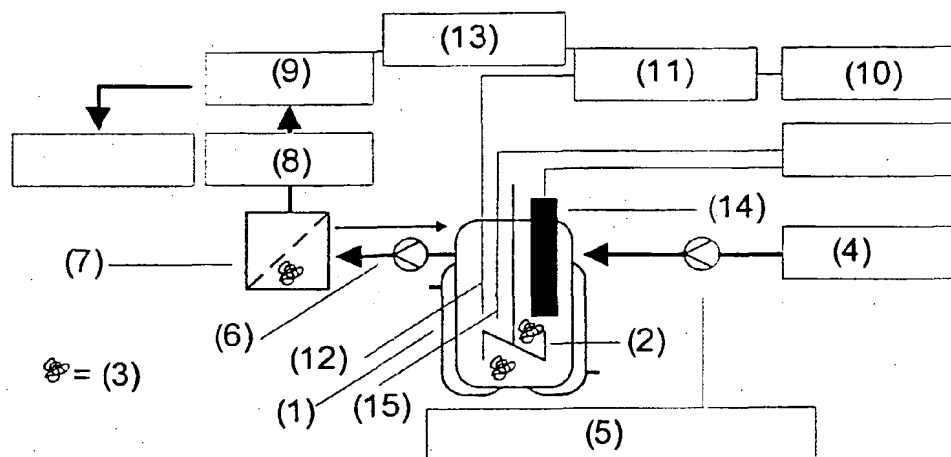
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÜTZ, Stephan [DE/DE]; An Haus Vendel, 50321 Brühl (DE). WANDREY, Christian [DE/DE]; Wolfshovener Strasse 139,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE ENZYMATIC OXIDATION OF SUBSTRATES USING H₂O₂

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN OXIDATION VON SUBSTRATEN MIT H₂O₂



(57) Abstract: The invention relates to a method for the enzymatic oxidation of substrates. When converting organic substrates using H₂O₂ by means of enzymes, the enzymes are deactivated during the course of the conversion by the aggressive H₂O₂. The invention therefore relates to a method for the enzymatic oxidation of substrates, which is characterised in that the H₂O₂ required for the conversion is produced electrochemically. Surprisingly, the enzyme is not deactivated by the H₂O₂ during this method, not even if the stationary concentration of H₂O₂ corresponds to that produced by conventional methods. The invention also relates to a device for carrying out said method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten. Bei der Umsetzung von organischen Substraten mit H₂O₂ mittels Enzymen besteht das Problem, dass die Enzyme im Reaktionsverlauf durch das aggressive H₂O₂ deaktiviert werden. Es wird daher erfindungsgemäss ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten zur Verfügung gestellt, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass das für die Reaktion notwendige H₂O₂ auf elektrochemischem Wege hergestellt wird. Überraschenderweise unterliegt das Enzym bei diesem Verfahren keiner Desaktivierung durch H₂O₂, und zwar auch dann nicht, wenn die stationäre Konzentration an H₂O₂ derselben Konzentration entspricht, welche durch konventionelle Verfahren herbeigeführt wird. Eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist in Figur 1 angegeben.

WO 02/36794 A1



52428 Jülich (DE). LIESE, Andreas [DE/DE]; Brockmüllerstrasse 15, 52428 Jülich (DE).

(74) **Gemeinsamer Vertreter:** FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Personal und Recht-Patente (PR-PT), 52425 Jülich (DE).

(81) **Bestimmungsstaat (national):** US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten
mit H_2O_2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten mit H_2O_2 nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

5 Bei der oxidativen Synthese insbesondere von organischen Zielverbindungen werden Substrate häufig mit H_2O_2 oxidiert. Bei diesen Reaktionen werden auch Katalysatoren eingesetzt, welche zu Produkten der gewünschten Re-
10 gio- oder Stereoselektivität führen. Bei der stereoselektiven organischen Synthese spielen insbesondere Enzyme als Katalysatoren eine wichtige Rolle.

Sulfoxide sind zum Beispiel wertvolle chirale Bausteine, die durch katalytische Synthese hergestellt werden können. Sie können in einer Vielzahl asymmetrischer,
15 chemischer Synthesen als chirales Auxiliar oder dirigierende Gruppe eingesetzt werden. Ebenso können sie Bestandteil von Wirkstoffen in der Pharmazie sein. Chemische Synthesen für chirale Sulfoxide sind bereits
20 zahlreich beschrieben (Kagan, H. et al. (1990), Synlett 11: 643-650). Wie allgemein in der Herstellung chiraler Verbindungen, sind auch zur Synthese von Sulfoxiden Biotransformationen eingesetzt worden (Holland, H. et al. (1999), J. Mol. Catal. B. 6: 463-471), insbesondere Haloperoxidasen: z. B. vanadiumhaltige Bromoperoxidasen

(Allenmark, S. et al. (1998), Tetrahedron 54: 15293-15304; Allenmark, S. et al. (2000), Biocatalysis and Biotransformation 18: 79-86). Wegen ihrer Selektivität
interessant ist Chloroperoxidase aus *Leptoxylum fuma-*
5 *go*. So setzt sie im Gegensatz zu anderen Peroxidasen
Arylalkylsulfide bevorzugt zum (R)-Sulfoxid um, während
andere Peroxidasen das (S)-Produkt bilden (Allenmark et
al. (1996), Tetrahedron: Asymmetry 7: 1089-1094;
Sheldon, R. (1997), Tetrahedron 53: 13813-13220).
10 Hierbei werden mit einer Reihe von Arylalkylsulfiden
und Alkylalkylsulfiden hohe Ausbeuten und hohe optische
Reinheiten erzielt.

Ein großes Problem bei allen bisher bekannten Umsetzun-
gen mit Chloroperoxidase und anderen enzymatischen und
15 nicht enzymatischen Katalysatoren ist jedoch deren
rasche Desaktivierung durch das Oxidationsmittel.
Meistens wird hierbei Wasserstoffperoxid verwendet. Die
Reaktionsparameter sind bereits für die Oxidation ver-
schiedener Sulfide mittels Chloroperoxidase optimiert
20 worden (Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bio-
engineering 55: 283-288). Nach der Verfahrensweise von
Deurzen bietet es sich an, bei einem pH-Wert von 5 (Ka-
liumphosphat-Puffer 100 mM) und einer Temperatur von
25 °C zu arbeiten. Es werden 30 Volumen-% tert-Butanol
25 als Cosolvens verwendet. Für ein kontinuierliches Ver-
fahren wird hierbei eine sensorgesteuerte Wasserstoff-
peroxid-Dosierung verwendet, die eine H₂O₂-Konzentra-
tion von 50 µM ermöglicht.

30 Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einer zeitabhängigen Ak-
tivitätsmessung der Chloroperoxidase in einem für die

Sulfoxidation relevanten Puffersystem bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von nur 50 μ M unter den von Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bioengineering 55: 283-288, beschriebenen Bedingungen.

5

Bedingt durch die rasche Desaktivierung des Enzyms im o.g. Puffersystem konnten zwar Umsetzungen durchgeführt werden, jedoch mit einer geringen Reaktionsstabilität des Biokatalysators. Die Reaktionsstabilität kann als maximale Zykluszahl angegeben werden (ttn, engl. total turnover number = Stoffmenge Produkt / Stoffmenge verbrauchtes Enzym). Einige Ergebnisse zeigt Tabelle 2, für die ebenfalls die Reaktionsbedingungen von Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bioengineering 55: 283-288, gelten.

10

15

Bekannt ist, daß zur Erhöhung der Reaktionsstabilität eine in situ Erzeugung von Wasserstoffperoxid beiträgt. Hierzu sind zwei Ansätze bekannt. Zum einen ein Verfahren, bei dem Sauerstoff mit chemischen Mitteln reduziert wird (Sheldon, R. et al. (1999), J. Mol. Catal. B 6: 453-461), wobei jedoch stets eine stöchiometrische Menge Nebenprodukt anfällt. Ebenso kann Wasserstoffperoxid durch die Oxidation von Glucose mit Sauerstoff und Glucose Oxidase durchgeführt werden (US Patent 4,284,723); die Enzyme können auch coimmobilisiert werden (Sheldon, R. et al. (2000), Biotechnology and Bioengineering 69: 286-291), was jedoch einen hohen verfahrenstechnischen Aufwand darstellt und ebenso kostenintensive Nebenreaktionen bei leicht erhöhter Stabilität um den Faktor 2 in Kauf nimmt. Bei der

20

25

30

chemischen in situ Erzeugung von H_2O_2 wird aus stöchiometrischen Gründen stets eine relativ hohe Konzentration an H_2O_2 gebildet, welche bei empfindlichen Katalysatoren oder Enzymen zu einer schnellen Desaktivierung führt.

Es ist daher die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur katalytischen Oxidation von Substraten mittels H_2O_2 zu schaffen, bei dem die Aktivität des Katalysators nicht durch das H_2O_2 herabgesetzt wird, die Aktivität des Katalysators also über lange Reaktionszeiträume konstant erhalten bleibt und welches kostengünstig und nicht aufwendig in der Verfahrensweise ist. Als Katalysator im Sinne der Erfindung ist ein Enzym zu verstehen, welches ein Substrat umsetzt. Im weiteren Sinne ist darunter aber auch ein Mikroorganismus zu verstehen, welcher das Substrat biokatalytisch mittels eines Enzyms umsetzt.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nunmehr möglich, Substrate in einer für den Katalysator schonungsvollen Weise mit H_2O_2 zu oxidieren. Das Verfahren ist kostengünstig, da auf teure Oxidationsreagenzien verzichtet werden kann. Auf viele Verfahrensschritte kann verzichtet werden, da keine Nebenprodukte gebildet werden, die abgetrennt werden müssen.

Die Figur und die Tabellen zeigen eine mögliche Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens sowie einige Beispiele für den Stand der Technik und erfindungsgemäße Parameter und Ergebnisse.

5

Es zeigt:

- Fig.1: Eine Vorrichtung
- Fig.2: Graphik zum Aktivitätsverlauf nach dem Stand der Technik
- 10 Fig.3: Umsatz- bzw. Aktivitätsverlauf für Beispiel 1.
- Fig.4: Umsatz-Zeitverlauf für Beispiel 2
- Fig.5: Umsatz-Zeitverlauf für Beispiel 3
- Fig.6: Vergleich der ttn-Werte zum Stand der Technik für kontinuierliche Reaktionen nach Beispiel 3
- 15
- Tabelle 1: Aktivitäts-Zeitverlauf nach dem Stand der Technik
- Tabelle 2: Restaktivität für verschiedene Verfahrenstypen nach dem Stand der Technik
- 20
- Tabelle 3a: Liste der Reste R_1 und R_2 für ein erfindungsgemäßes Substrat der allgemeinen Formel R_1-S-R_2
- Tabelle 3b: Substrate, welche durch Chloroperoxidase epoxidiert werden.
- 25
- Tabelle 3c: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Anwesenheit von Halogenidionen.

Tabelle 3d: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Abwesenheit von Halogenidionen.

Tabelle 4: Versuchsergebnisse

5

Tabelle 5: Versuchsergebnisse

Tabelle 6: Versuchsergebnisse

Tabelle 7: Versuchsergebnisse

Im Folgenden soll die Erfindung erläutert werden:

10

Figur 1 zeigt eine für die Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung. Sie besteht aus einem Reaktor 1, der mit einem Rührer 2 ausgestattet ist und in dem sich die Reagenzien und der Katalysator 3 befinden. Der Reaktor 1 besitzt einen Substratzufluß 4, der über eine Regeleinheit 5 gesteuert ist und einen Abfluß 6, der über ein Membranfilter 7 in eine Blasenfalle 8 führt, die mit einem Polarimeter 9 in Verbindung steht, welches als Meßinstrument für die Ausbeute der Reaktion dient. Der Reaktor 1 wird durch einen Sauerstoffvorrat 10 gespeist, der mit einem Massenflußmesser 11 über eine Leitung 12 mit dem Reaktor 1 verbunden ist. Das Polarimeter 9 und der Massenflußmesser 11 sind mit einer Datenverarbeitungsanlage 13 verbunden. In den Reaktor 1 ragen eine Kathode 14 und eine Gegenelektrode 15, die einen Stromeintrag in den Reaktor 1 bewirken. Durch die gezielte Steuerung der Stromstärke kann eine genau an die jeweils vorliegenden Synthesebedingungen angepaßte H_2O_2 -Produktionsgeschwindigkeit erreicht werden. Die stationäre Konzentration an H_2O_2 ist daher von Anfang an gering, insbesondere dann, wenn die Oberflä-

che der Kathode großflächig ausgebildet ist, so daß die räumliche Verteilung des gebildeten H_2O_2 von Anfang an sehr groß ist. Im Gegensatz zur konventionellen Zudosierung von H_2O_2 in konzentrierten oder bereits verdünnten Lösungen entsteht in keinem Zeitpunkt eine stationäre und oder punktuelle Konzentration, die so hoch ist, daß das Enzym oder der Mikroorganismus, welcher die Umsetzung durchführt, desaktiviert werden kann. Weiterhin wird der Reaktionsprozeß durch das ständige Rühren begünstigt.

Figur 2 zeigt den Zeitverlauf der Aktivität in % für ein Reaktionssystem gemäß Tabelle 1 nach dem Stand der Technik mit

30% tert.-Butanol: Puffergemisch $t_{1/2} = 36 \text{ min}^{-1}$ $[H_2O_2] = 50 \mu\text{M}$. Desaktivierungsrate $1,8\% \text{ min}^{-1}$.

Abszisse x: Aktivität [%] Chloroperoxidase (CPO)
Ordinate y: [t/min]

Figur 3 zeigt das Ergebnis für das erfindungsgemäße Beispiel 1:

Ordinate x: Umsatz • von Thioanisol;
Aktivität o von CPO in [%]
Abszisse y: Zeit [min]

Figur 4 zeigt das Ergebnis für Beispiel 2:

Abszisse x: Umsatz [%] von Thioanisol
Ordinate y: Zeit [h]

Figur 5 zeigt das Ergebnis für Beispiel 3:

Abszisse x: Umsatz [%] von Thioanisol

Ordinate y: Zeit [h]

5 Figur 6 zeigt das Ergebnis für Tabelle 5:

Abszisse x: ttn [10^3]

Ordinate y: ttn Werte links Stand der Technik,
rechts erfindungsgemäß

10 Erfindungsgemäß wird nun bei einer katalytischen Oxidation eines Substrates Sauerstoff in die Lösung eingeleitet, welcher durch die Kathode zu H_2O_2 reduziert wird. Die elektrochemische Herstellung des H_2O_2 muß nicht zwingend im Reaktor 1 erfolgen, sondern kann auch
15 außerhalb des Reaktors stattfinden, wobei das gebildete H_2O_2 anschließend in den Reaktor 1 eingeleitet wird, jedoch ist die H_2O_2 -Herstellung im Reaktor 1 bevorzugt. Erfindungswesentlich ist hierbei, daß das H_2O_2 in einer solchen Konzentration gebildet wird, bzw. in einer solchen Konzentration vorliegt, daß ein gegenüber H_2O_2
20 empfindlicher Katalysator nicht desaktiviert wird. Dies ist in der Regel dann der Fall, wenn die Elektrolyse mit H_2O_2 -Produktionsraten durchgeführt wird, die geringer oder gleich sind als die Menge H_2O_2 , die der Katalysator umsetzen kann. In dieser bevorzugten Verfahrensweise ist die Produktionsrate von H_2O_2 maximal so hoch, wie es dem K_m -Wert des Biokatalysators für die spezifische Reaktion entspricht. Beispielfhaft können Reaktionsbedingungen angegeben werden, bei denen eine
25 Graphitelektrode einer Oberfläche von 6 cm^2 eine Strom-
30

dichte von $0,1-5 \text{ mAcm}^{-2}$, oder $0,3-1,0 \text{ mAcm}^{-2}$ und bei CPO von $0,5 \text{ mAcm}^{-2}$ in das Reaktionssystem einträgt. Diese Werte sind jedoch nicht beschränkend auszulegen, da die für den Spezialfall günstigste Stromdichte von einer
5 Vielzahl von Parametern, wie Konzentration der Einzelkomponenten und damit der Geschwindigkeit der Umsetzung und der Instabilität des Enzyms gegenüber H_2O_2 abhängt. Im Allgemeinen gilt jedoch, daß die Elektrolyse am Besten mit H_2O_2 -Produktionsraten durchgeführt wird, die
10 geringer oder gleich sind als die Menge H_2O_2 , die der Katalysator umsetzen kann. Bei der Sulfoxidation kann von einem K_m -Wert von $< 100 \text{ } \mu\text{M}$ ausgegangen werden.

Empfindliche Katalysatoren im Sinne der Erfindung sind
15 Enzyme, die in Gegenwart von H_2O_2 desaktiviert werden. Beispiele hierfür sind Oxidoreduktasen, wie Peroxidasen, NADH-Peroxidase (1.11.1.1.), NADPH-Peroxidase (1.11.1.2.), Fatty acid peroxidase (1.11.1.3.), Myeloperoxidase (1.11.1.7.), Glutathione peroxidase
20 (1.11.1.9.), L-ascorbate peroxidase (1.11.1.11.), Mangan Peroxidase (1.11.1.13) (die Numerierung entspricht der CPO-Nomenklatur (1.11.1.10), besonders bevorzugt die Haloperoxidasen, Chloroperoxidasen, Bromoperoxidasen, Jodoperoxidasen.

25 In dem erfindungsgemäßen Reaktionssystem können sich auch zwei oder mehrere Katalysatoren bzw. Enzyme befinden, die nebeneinander ablaufende oder in einer Nachfolge ablaufende Reaktionen katalysieren. Die Katalysatoren können sowohl frei in der Lösung vorliegen, als
30 auch an Festphasen immobilisiert sein. Nach dem Stand der Technik wird die Immobilisierung häufig dann ver-

wendet, wenn ein Katalysator bzw. Enzym kinetisch anfällig gegen Desaktivierung ist, zum Beispiel bedingt durch chemische Reaktion des Katalysators mit einer der im System befindlichen Komponenten. Das erfindungsgemäße Verfahren trägt dazu bei, daß auf eine Immobilisierung an einem Festkörper verzichtet werden kann, zumindest um den Katalysator vor Desaktivierung zu schützen. Es kann jedoch aus anderen verfahrenstechnischen Gründen vorteilhaft sein, eine Immobilisierung an einer Polymermatrix vorzunehmen, da eine Zurückgewinnung des Katalysators so leichter möglich ist.

Die enzymatischen Umsetzungen werden in wäßriger Lösung durchgeführt, jedoch können zur Steigerung der Substratlöslichkeit, insbesondere von organischen Substraten, organische Lösungsmittel als Cosolventien eingesetzt werden, die in Konzentrationen von beispielsweise 1 bis 50% oder vorzugsweise 10 bis 30%, besonders bevorzugt 15%, eingesetzt werden können. Beispielfhaft können Lösungsmittel wie tert.-Butanol, PEG 600, 2-Butanon, Ethylenglykol, 2-Propanol, Aceton, Ethanol, 2-Butanol, PEG 20000, Ethylenglycolmonobuthylester genannt werden.

Die Reaktionsbedingungen für enzymatische Katalysen werden vorzugsweise so gewählt, daß ein pH-Wert von 3-8 vorliegt. Besonders bevorzugte pH-Werte liegen bei 4,5-5,5.

Die günstigsten Reaktionsbedingungen finden sich in einem Temperaturbereich zwischen 5 und 30 °C, besonders bevorzugt sind Reaktionstemperaturen zwischen 15 und 25 °C.

5

Als Substrate können in den Reaktionen die, für die Katalysatoren, entsprechenden Substrate eingesetzt werden. Diese sind grundsätzlich nicht auf einzelne Beispiele beschränkt, jedoch sind in den Tabellen 3a bis d beispielhaft einige Substrate angeführt, die für die Reaktionen eingesetzt werden können. Diese beispielhaft aufgeführten Substrate können zum Beispiel für Reaktionen mit Peroxidasen, allgemeiner Oxidoreduktasen, eingesetzt werden. Natürlich können sie auch bei Enzymreaktionen anderer Enzyme eingesetzt werden, die diese Substrate umsetzen.

15

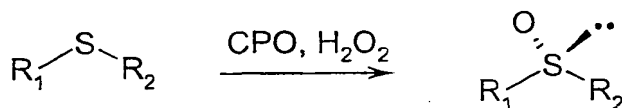
Generell kommen organische Substrate, wie Sulfide, Olefine, Olefinester, aromatische Olefine, Alkine, Cyclopropan, substituiertes Cyclopropan, Sulfoxide, Thiole, Carbonsäuren, Heteroaromaten, Aromaten, halogensubstituierte Aromaten, Phenole, o-, m-, p-alkylsubstituierte Phenole, Anilin, N-Di oder monoalkylsubstituiertes Anilin oder Alkohole in Betracht.

20

25

In einem Ausführungsbeispiel gemäß Formel 1 kann die stereoselektive Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden mittels Chloroperoxidase (E.C.1.11.1.10), die nach einer anderen Nomenklatur mit CAS [9055-20-39] bezeichnet wird, beschrieben werden.

30



Formel 1

5 R_1 = eine Komponente aus der Gruppe Alkyl, Aryl, Phenyl, alkylsubstituiertes Aryl (Tolyl), halogensubstituiertes Aryl- (m-Chlorphenyl, p-Chlorophenyl, m-Bromophenyl-, p-Bromophenyl), m-Methoxyphenyl, p-Methoxyphenyl, p-Nitrophenyl, heterosubstituiertes Aryl (5,6,7-gliedrige aromatische Ringe mit O,S,N, z. B. Thiophen)

10 R_2 = eine Komponente aus der Gruppe Alkyl (Methyl, Ethyl, n-Propyl)

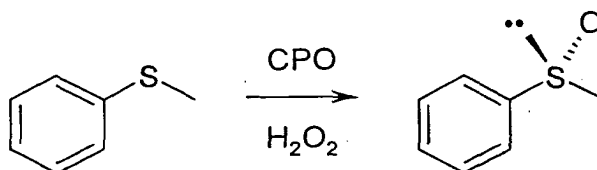
15 Die Substrate können einer Formel aus allen Unterkombinationen von R_1 und R_2 entsprechen oder Verbindungen sein, bei denen $\text{R}_1 = \text{R}_2$ ist, oder Substrate sein, bei denen R_1 und R_2 Bestandteil eines cyclischen Systems (z.B. Thiochroman, 2,3-Dihydro[b]Benzothiophen) ist.

20 Unter Alkyl sind sowohl für R_1 und R_2 geradkettige als auch verzweigte Kohlenwasserstoffketten zu verstehen, wobei die Komponenten auch mit Heteroatomen, wie z. B. O, N, F, Cl, Br und I substituiert sein können. Beispielfhaft können Methyl, Ethyl, n-Propyl, i-Propyl,

25 t-Butyl genannt werden.

Unter Aryl sind aromatische Systeme, eingeschlossen Heteroaromaten, und substituierte aromatische Systeme zu verstehen.

Beispielhaft kann eine Umsetzung nach Formel 2 angeführt werden.



5

Formel 2

Überraschend hat sich gezeigt, daß die Chlorperoxidase aus *Leptoxiphium fumago* (E.C. 1.11.1.10) entgegen allen bisherigen Experimenten in der Lage ist, kontinuierlich Oxidationen von Sulfiden durchzuführen, wenn die Bereitstellung des Oxidationsmittels erfindungsgemäß durch kathodische Reduktion von Sauerstoff erfolgt. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine bequeme Einstellung der Dosierrate über die Stromdichte, und als Nebenprodukt fällt ausschließlich Wasser an. Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher insbesondere kostengünstig und umweltfreundlich.

Chlorperoxidase ist z. B. in der Lage, Thioanisol (Methylphenylsulfid) bei einer Limitierung der Wasserstoffperoxid-Dosierung durch das erfindungsgemäße Verfahren in einer Konzentration von 3,7 g/L Thioanisol (=20 mM) in einem Volumen von 50 mL innerhalb von 5 Stunden vollständig umzusetzen.

25

Das Verfahren kann in den üblichen Reaktoren durchgeführt werden, die zusätzlich mit einer Elektrodenanordnung und einer Sauerstoffbegasung versehen sind. So

können z. B. herkömmliche Rührreaktoren in diskontinuierlicher oder kontinuierlicher Betriebsweise eingesetzt werden.

Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens vermindert sich der kostenintensive Katalysatorverbrauch deutlich.

Werden als Biokatalysatoren Mikroorganismen eingesetzt, die die Oxidation des Substrates durch eine enzymatische Reaktion durchführen, so ist es gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls vorteilhaft, daß der Mikroorganismus nicht durch H_2O_2 angegriffen wird. In dem Mikroorganismus kann das Enzym überexprimiert sein.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von speziellen Beispielen näher beschrieben:

Beispiel 1 : Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im Rührreaktor

Chloroperoxidase wurde käuflich erworben (z. B. Sigma C-0287), in Puffergemisch gelöst (Kaliumphosphat 0,1 M; pH 4,5; 30 Vol% t-BuOH), Thioanisol zugegeben, die Lösung mit Sauerstoff begast und die Umsetzung durch Elektrolyse gestartet.

Ansatz: 5 mL Reaktionsvolumen

0,1 mmol Thioanisol

15 U Chloroperoxidase (0,28 nmol)

Nach 10, 20, 35 und 55 Minuten wurden jeweils Proben entnommen und mittels gaschromatographischer

(GC-) Analyse der Gehalt an restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt (Fig.3).

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

5 Kapillarsäule: HP1 (Länge 12 m, $\varnothing=0,25$ mm), Trägergas: Stickstoff, Injektor: Split, 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur: 60 °C (0,5 min), 20 °C·min⁻¹, 200 °C (2 min)

10 Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß das eingesetzte Sulfid nach 40 Minuten praktisch vollständig zum Sulfoxid umgesetzt worden ist.

15 Nach der Umsetzung wurden noch 73% Enzymaktivität wiedergefunden, was einer ttn von 360.000 entspricht (Faktor 2,4 gegenüber bekannten Verfahren).

20 Beispiel 2 : Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im Rührreaktor mit Produktextraktion im repetitive batch

Verfahren gemäß Beispiel 1. Nach vollständiger Umsetzung wird das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert, neues Substrat zugegeben und die Elektrolyse fortgesetzt.

Ansatz: 50 mL Reaktionsvolumen

4*1 mmol Thioanisol

50 U Chloroperoxidase (0,93 nmol)

30 Die Elektrolyse wird nach entsprechendem Ladungsfluß unterbrochen, Proben entnommen und mittels gaschroma-

tographischer (GC-) Analyse der Gehalt an restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt. Die verschiedenen Versuchsläufe sind in Fig. 4 dargestellt. Der Ladungsfluß pro Lauf betrug 193 C (Coulomb).

5

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

Kapillarsäule: HP1 (Länge 12 m, $\varnothing=0,25$ mm), Trägergas: Stickstoff, Injektor: Split, 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur: 60 °C (0,5 min),
20 °C·min⁻¹, 200 °C (2 min)

10

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß das jeweils eingesetzte Sulfid nach maximal 360 Minuten praktisch vollständig zum Sulfoxid umgesetzt worden ist.

15

Zwischen Lauf 2 und Lauf 3 war die Reaktion unterbrochen. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren konnte eine enorme Stabilitätssteigerung der Chloroperoxidase erzielt werden (Umsetzung über 29 Stunden), wobei eine ttn von 1.100.000 erreicht werden kann (Faktor 7 gegenüber bekannten Verfahren).

20

Beispiel 3: Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im kontinuierlichen Rührreaktor

25

Chloroperoxidase wurde käuflich erworben (z. B. Sigma C-0287), in Puffergemisch gelöst (Kaliumphosphat 0,1 M; pH 4,5; 30 Vol% t-BuOH), Thioanisol zugegeben, die Lösung mit Sauerstoff begast und die Umsetzung durch

30

Elektrolyse (Arbeitselektrode Graphit (9 cm²), galvanostatisch 0,4 mA/cm²) gestartet. Der hierzu verwendete Reaktor ist in Figur 1 skizziert.

- 5 Ansatz: 50 mL Reaktorvolumen
 1L 20 mmol Thioanisol in Puffergemisch
 400 U Chloroperoxidase (7 nmol)

Der Reaktorauslauf wird fraktioniert gesammelt und mittels gaschromatographischer (GC-) Analyse der Gehalt an
10 restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt.

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

Kapillarsäule : Cyclodex β -1P (Länge 50 m,
Ø = 0,32 mm), Trägergas: Helium, Injektor: Split,
15 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur 40 °C
 (5 min), 20 °C·min⁻¹, 160 °C (5 min)

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß nach der Anlaufphase ein kontinuierlicher Umsatz von ~ 50 % erreicht wird.
20

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten kontinuierliche Umsetzungen über einen Zeitraum von 65 Stunden durchgeführt werden, was gegenüber der anfangs (Tab. 1)
25 gezeigten starken Desaktivierungsrate eine erhebliche Verbesserung darstellt. Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet zum ersten Mal eine kontinuierliche stereoselektive Oxidation von Sulfiden mit Chloroperoxidase ohne signifikante Desaktivierung. Die Reaktionsstabilität (ttn 260.000) konnte um den Faktor 14 gegenüber
30

kontinuierlichen Verfahren mit herkömmlicher Dosier-
technik gesteigert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können stationäre
Konzentrationen von weniger als 50 μM H_2O_2 erzeugt wer-
den. Auch wenn die in die Reaktionslösung eingetragene
Ladungsmenge zu einer stationären Konzentration von
50 μM H_2O_2 führt, die nach dem Stand der Technik eben-
falls erreicht wird, ist die Desaktivierung des Enzyms
unterbunden, so daß für das erfindungsgemäße Verfahren,
selbst bei gleicher stationärer Konzentration von H_2O_2
wie bei dem Stand der Technik, ein besseres Ergebnis,
das heißt keine Desaktivierung des Enzyms beobachtet
wird.

Die Verbesserungen durch diese neue Methode sind in Ta-
belle 7 zusammengefaßt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die
stereoselektive Synthese von organischen Verbindungen
geeignet, da mit ihm die Ausbeute an enantiomerenreinem
Produkt nicht gemindert wird, und der Vorteil der enzy-
matischen Reaktion gegenüber anderen nicht enantiose-
lektiven Methoden erhalten bleibt. Es kann somit bevor-
zugt zur Synthese chiraler Produkte und anderer Wert-
stoffe eingesetzt werden.

Tabelle 1: Zeitabhängige Aktivitätsbestimmung der Chloroperoxidase bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 50 μM

Zeit (min)	rel. Aktivität (%)
0	100
10	79,2
20	73,6
30	56,8
40	52,8
50	36,8
60	27,2

Tabelle 2: Reaktionsstabilität der Chloroperoxidase für die Sulfoxidation

Reaktionsführung	ttn	Restaktivität
Batch	148.000	5 %
Fed-Batch	145.000	0 %
kontinuierlich	19.200	-

Tabelle 3a: Liste der Reste R_1 und R_2 für ein erfindungsgemäßes Substrat der allgemeinen Formel R_1-S-R_2

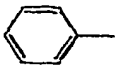


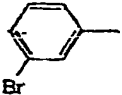
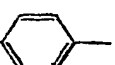

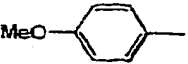

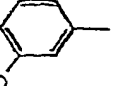
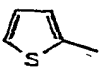
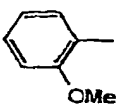
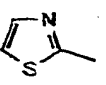
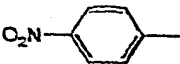
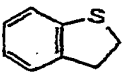

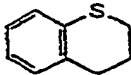
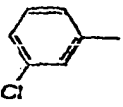
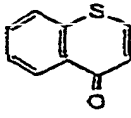
R_1	R_2	R_1	R_2	cyclisches Sulfi
	CH_3		CH_2	
	CH_2CH_3		CH_3	
	$CH_2CH_2CH_3$		CH_2CH_3	
	CH_3		CH_2CH_3	
	CH_3		CH_2	
	CH_3		CH_3	
	CH_3			
	CH_3			
	CH_2			

Tabelle 3b: Substrate, welche durch Chloroperoxidase
epoxidiert werden

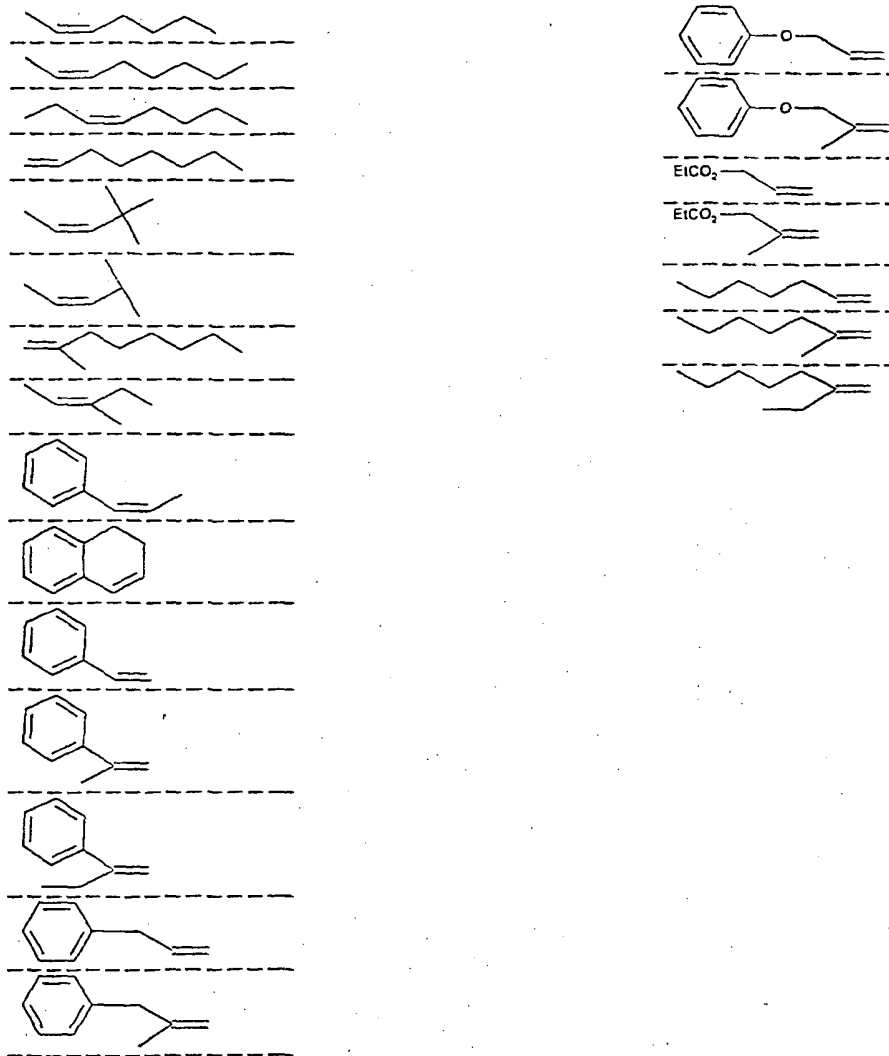


Tabelle 3c: Beispiele für Substrate bei der chloropero-
xidasekatalysierten Reaktion bei Anwesen-
heit von Halogenidionen

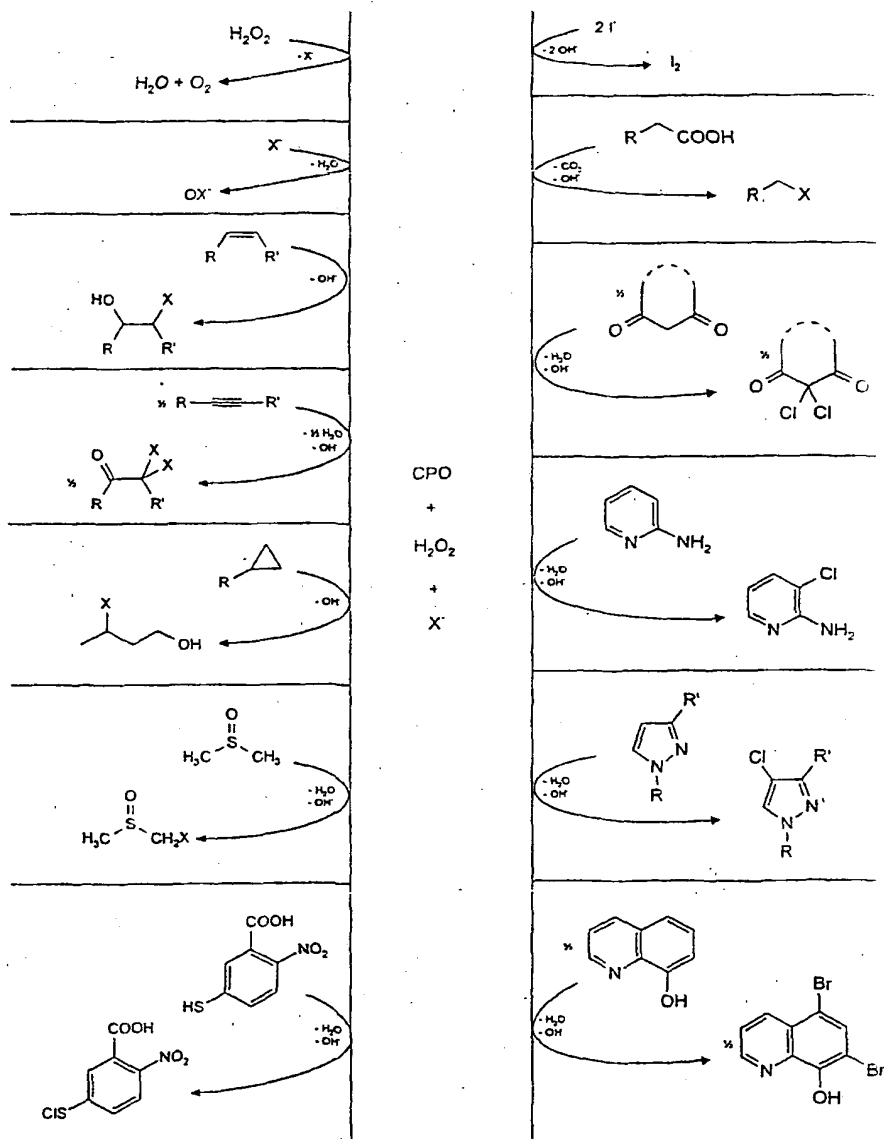


Tabelle 3d: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Abwesenheit von Halogenidionen

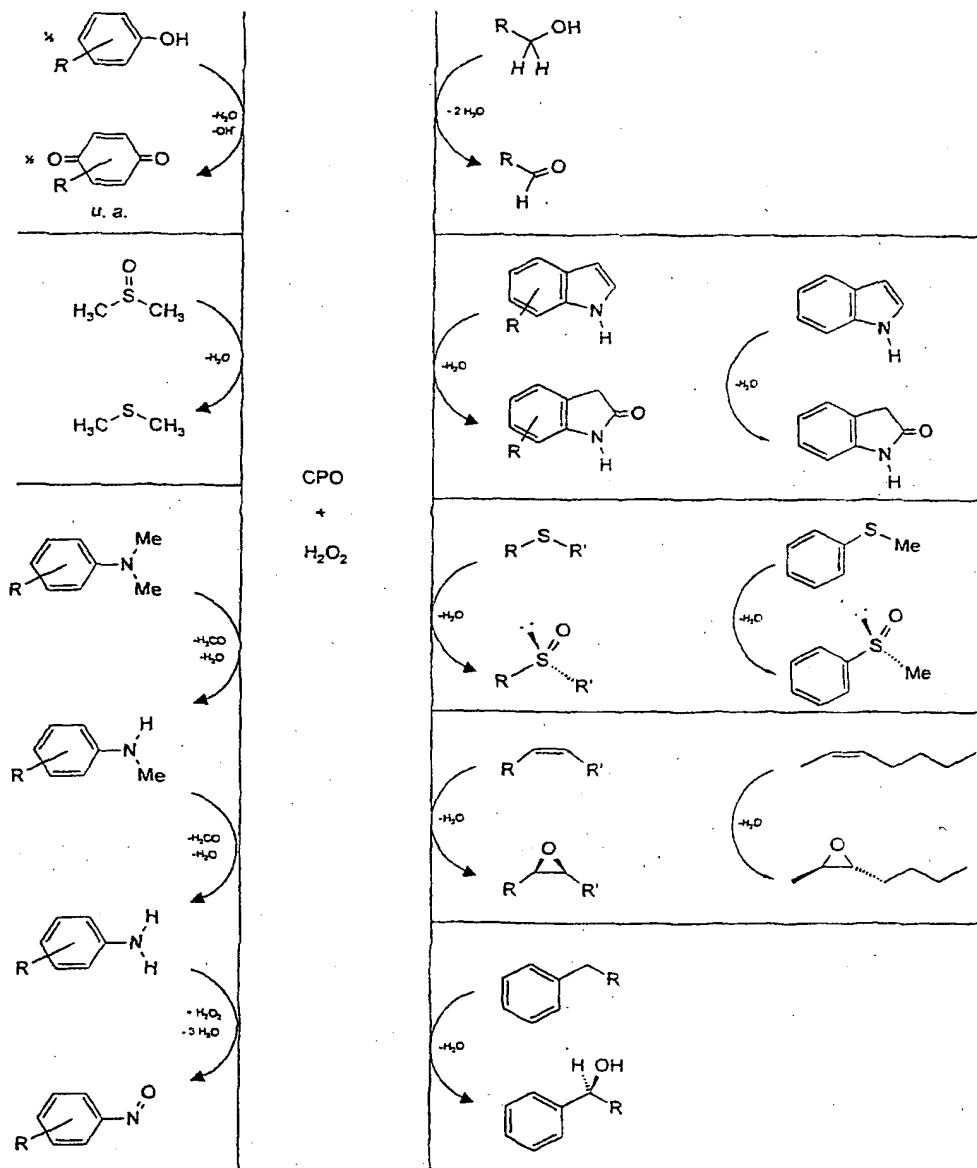


Tabelle 4: Zeitabhängigkeit der Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase

Zeit (min)	Thioanisol (%)	Methylphenylsulfoxid (%)
0	100	0
10	68	32
20	56	44
35	15	85
55	0	100

Tabelle 5: Zeitabhängigkeit der Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase im repetitive batch

Lauf	Zeit (min)	Thioanisol (%)	Methylphenylsulfoxid (%)
1	0	100	0
	350	15	85
2	400	84	16
	720	5	95
3	1000	92	8
	1270	1	99
4	1400	89	11
	1720	1	99

Tabelle 6: Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase im kontinuierlichen Reaktor

Zeit (h)	Thioanisol (%)	Methylphenylsulfoxid (%)
0	100	0
5	65	35
11	47	53
15	45	55
21	48	62
25	47	63
31	47	53
35	50	50
41	45	55
45	49	51
51	46	54
55	30	70
61	33	67
65	52	48

Tabelle 7: Vergleich der kontinuierlichen Verfahren
zur Sulfoxidsynthese mit Chloroperoxidase

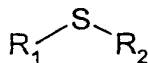
Verfahren	ttn	CPO-Dosierung U /h
herkömmlich	19000	590
Erfindung	260000	0

P a t e n t a n s p r ü c h e

-
1. Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substra-
ten mit H_2O_2 ,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß das Substrat mittels mindestens eines Katalysa-
tors mit auf elektrochemischem Wege erzeugtem H_2O_2
umgesetzt wird.
 2. Verfahren nach Anspruch 1,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der ein
Enzym beinhaltet.
 3. Verfahren nach Anspruch 2,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß als Enzym eine Oxidoreduktase eingesetzt wird.
 4. Verfahren nach Anspruch 3;
dadurch gekennzeichnet,
20 daß als Oxidoreduktase eine Peroxidase eingesetzt
wird.
 5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß als Peroxidase eine Haloperoxidase eingesetzt
wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Haloperoxidase mindestens eine Komponente
aus der Gruppe Chloroperoxidase, Bromoperoxidase
5 und Jodoperoxidase eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß Chloroperoxidase (E.C.1.11.1.10) aus *Lepto-*
10 *xyphium fumago* eingesetzt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Substrat ein organisches Substrat einge-
15 setzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß als organisches Substrat eine Komponente aus
20 der Gruppe der Sulfide, Olefine, Olefinester, aro-
matische Olefine, Alkine, Cyclopropan, substituier-
tes Cyclopropan, Sulfoxide, Thiole, Carbonsäuren,
Heteroaromaten, Aromaten, halogensubstituierte Aro-
maten, Phenole, o-, m-, p-alkylsubstituierte Phenole,
25 Anilin, N-Di oder monoalkylsubstituiertes Anilin o-
der Alkohole eingesetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Substrat ein Sulfid der Formel 1



5

eingesetzt wird, bei dem R₁ Alkyl oder Aryl, Heteroaryl, substituiertes Aryl ist und R₂ Alkyl ist.

- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Alkylrest ein Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-,
i-Propyl-, t-Butylrest ist.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Alkylrest durch Heteroatome wie O, N, F,
Cl, Br, und J substituiert ist.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß H₂O₂ durch kathodische Reduktion in situ erzeugt
wird.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß die H₂O₂ Produktionsgeschwindigkeit höchstens so
hoch ist, wie es dem K_m-Wert des Biokatalysators
entspricht.

30

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet;
daß die Reaktion bei einem pH-Wert zwischen 3 und 8
durchgeführt wird.

5

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Reaktionslösung ein organisches Lösungsmittel
beigemischt ist.

10

17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß als organisches Lösungsmittel tert.-Butanol
verwendet wird.

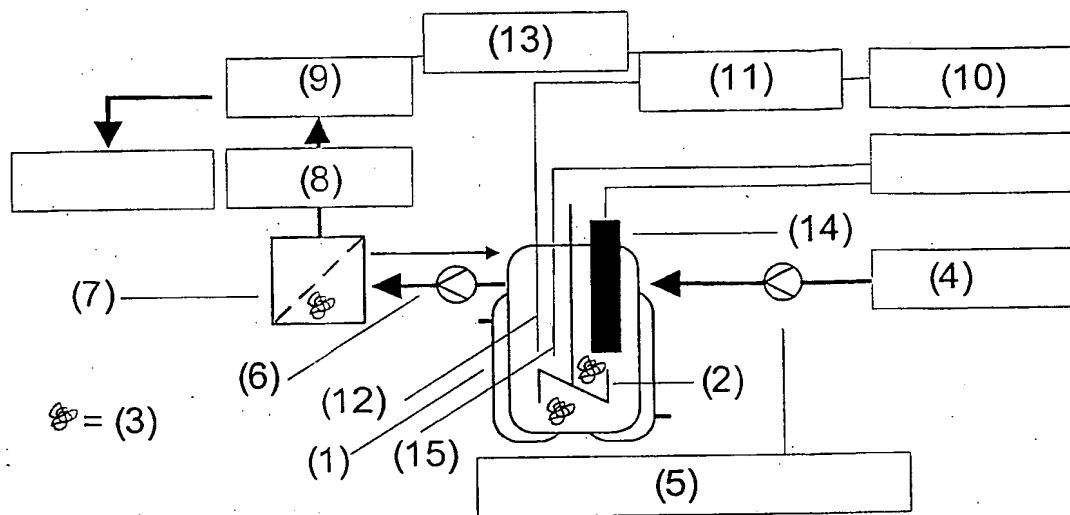
15

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reaktion bei einer Temperatur von 5 bis
30 °C durchgeführt wird.

20

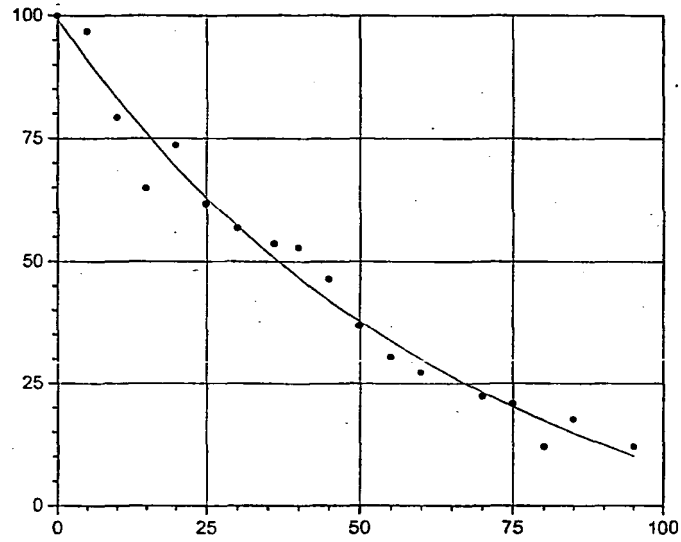
19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reaktion bei einer Temperatur von 15 bis
25 °C durchgeführt wird.

1/4

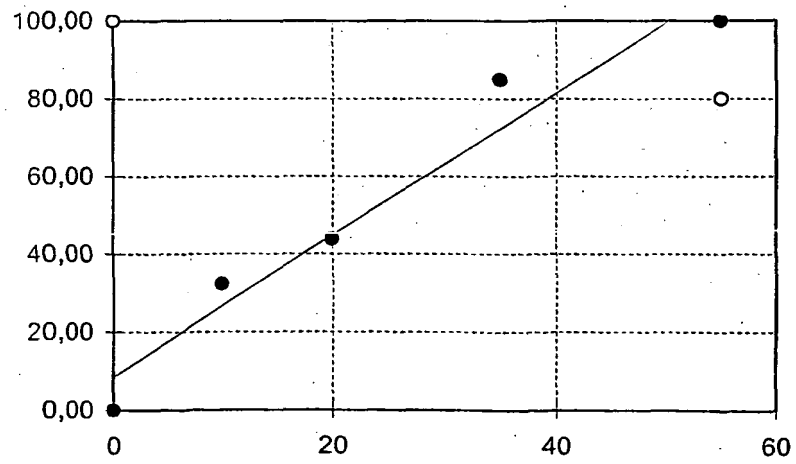


Figur 1

2/4

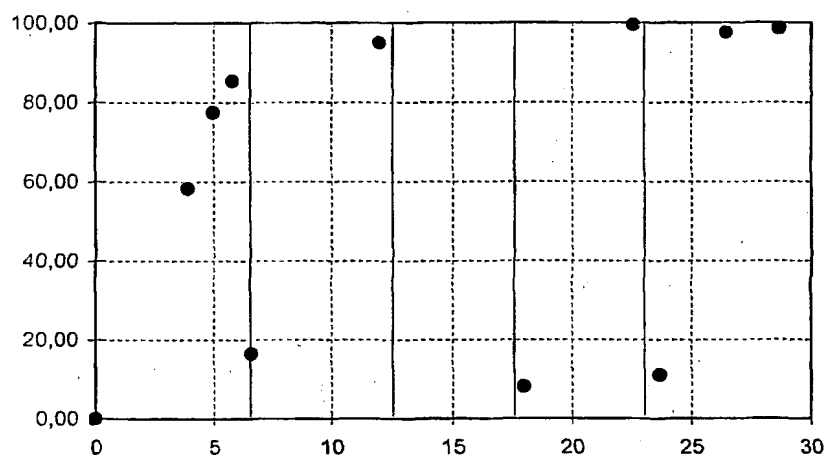


Figur 2

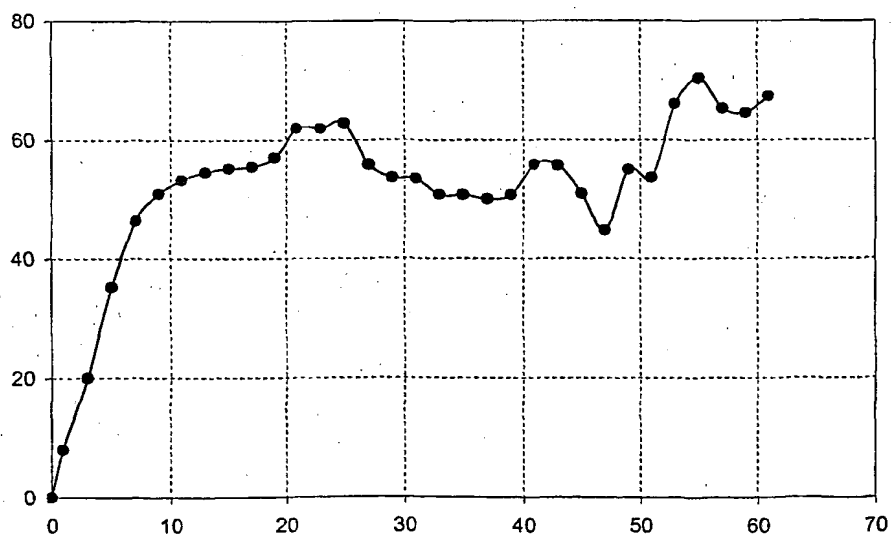


Figur 3

3/4

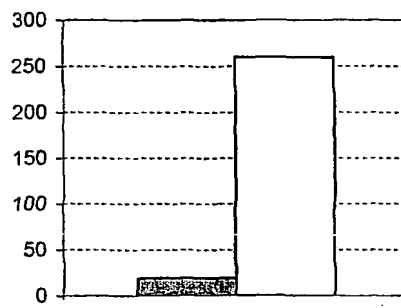


Figur 4



Figur 5

4/4



Figur 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/DE 01/04107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P7/00 C12P1/00 //C12N9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTLETT, PN ET AL.: "Approaches to the Integration of Electrochemistry and Biotechnology II. The Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by Electrogenerated Hydrogen Peroxide" JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, vol. 146, no. 3, 1999, pages 1088-1092, XP002191300	1-4
Y	page 1090 -page 1092 the whole document --- -/--	5-19



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 2002

Date of mailing of the international search report

04/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ☐ International Application No

PCT/DE 01/04107

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN JK & NOBE K: "Oxidation of Dimethylaniline by Horseradish Peroxidase and Electrogenenerated Peroxide. I. Free Enzyme Studies" J ELECTROCHEM SOC, vol. 140, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 299-303, XP001064971 the whole document	1-4
Y	VAN DE VELDE, F ET AL.: "Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 69, no. 3, 5 August 2000 (2000-08-05), pages 286-291, XP002191301 cited in the application the whole document	1-19
Y	SEELBACH, K ET AL.: "Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 55, no. 2, 20 July 1997 (1997-07-20), pages 283-288, XP002191302 cited in the application page 286; table 1	1-19
A	WO 96 06909 A (DEGUSSA ; LAATSCH HARTMUT (DE); SCHRAPEL THOMAS (DE); BERKESSEL ALB) 7 March 1996 (1996-03-07) claims 1-5	1-19
A	COLONNA, S ET AL: "Recent biotechnological developments in the use of peroxidases" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 17, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 163-168, XP004162835 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-19
A	D. PLETCHER: "Electrogenenerated Hydrogen Peroxide - From History to New Opportunities" WATTS NEW, A NEWSLETTER FROM ELECTROSYNTHESIS COMPANY, 'Online! vol. 4, no. 1, January 1999 (1999-01), XP002191684 Lancaster, NY, USA Retrieved from the Internet: <URL:www.electrosynthesis.com/news/w7content.html> 'retrieved on 2002-02-28! the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/04107

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9606909	A	07-03-1996	DE 4430327 C1	09-05-1996
			AU 3472495 A	22-03-1996
			WO 9606909 A2	07-03-1996
			EP 0777718 A2	11-06-1997
			TR 960173 A2	21-06-1996
<hr/>				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12P7/00 C12P1/00 //C12N9/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BARTLETT, PN ET AL.: "Approaches to the Integration of Electrochemistry and Biotechnology II. The Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by Electrogenerated Hydrogen Peroxide" JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, Bd. 146, Nr. 3, 1999, Seiten 1088-1092, XP002191300	1-4
Y	Seite 1090 -Seite 1092 das ganze Dokument ----- -/-	5-19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. März 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/04/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bucka, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEN JK & NOBE K: "Oxidation of Dimethylaniline by Horseradish Peroxidase and Electrogenenerated Peroxide. I. Free Enzyme Studies" J ELECTROCHEM SOC, Bd. 140, Nr. 2, Februar 1993 (1993-02), Seiten 299-303, XP001064971 das ganze Dokument	1-4
Y	VAN DE VELDE, F ET AL.: "Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 69, Nr. 3, 5. August 2000 (2000-08-05), Seiten 286-291, XP002191301 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-19
Y	SEELBACH, K ET AL.: "Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 55, Nr. 2, 20. Juli 1997 (1997-07-20), Seiten 283-288, XP002191302 in der Anmeldung erwähnt Seite 286; Tabelle 1	1-19
A	WO 96 06909 A (DEGUSSA ;LAATSCH HARTMUT (DE); SCHRAPEL THOMAS (DE); BERKESSEL ALB) 7. März 1996 (1996-03-07) Ansprüche 1-5	1-19
A	COLONNA, S ET AL: "Recent biotechnological developments in the use of peroxidases" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 163-168, XP004162835 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument	1-19
A	D. PLETCHER: "Electrogenenerated Hydrogen Peroxide - From History to New Opportunities" WATTS NEW, A NEWSLETTER FROM ELECTROSYNTHESIS COMPANY, 'Online! Bd. 4, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), XP002191684 Lancaster, NY, USA Gefunden im Internet: <URL:www.electrosynthesis.com/news/w7content.html> 'gefunden am 2002-02-28! das ganze Dokument	1-19

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In: Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04107

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9606909	A	07-03-1996	DE	4430327 C1	09-05-1996
			AU	3472495 A	22-03-1996
			WO	9606909 A2	07-03-1996
			EP	0777718 A2	11-06-1997
			TR	960173 A2	21-06-1996
